



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

**CAMPUS II- AREIA-PB**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ANDREZA FERNANDES GOMES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFETIVIDADE DE COMPOSTOS ANTISSEPTICOS  
BUCAIS NO CONTROLE DA PLACA BACTERIANA DE CÃES E GATOS**

**AREIA**

**2019**

ANDREZA FERNANDES GOMES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFETIVIDADE DE COMPOSTOS ANTISSEPTICOS  
BUCAIS NO CONTROLE DA PLACA BACTERIANA DE CÃES E GATOS**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito parcial  
para obtenção do título de bacharel  
em medicina veterinária pela  
Universidade Federal da Paraíba.

**Orientador:** Profº. Artur Cezar de  
Carvalho Fernandes.

AREIA

2019

## **Catálogo na publicação**

### **Seção de Catalogação e Classificação**

G633a Gomes, Andreza Fernandes.

Avaliação in vitro da efetividade de compostos  
antissépticos bucais no controle da placa bacteriana de  
cães e gatos / Andreza Fernandes Gomes. - Areia, 2019.  
28 f. : il.

Orientação: Artur Cezar de Carvalho Fernandes.  
Monografia (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Saúde bucal. 2. Antissépticos. 3. Atividade  
antimicrobiana. 4. Periodontite. I. Fernandes, Artur  
Cezar de Carvalho. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CAMPUS II - AREIA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

ANDREZA FERNANDES GOMES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFETIVIDADE DE COMPOSTOS ANTISSEPTICOS  
BUCAIS NO CONTROLE DA PLACA BACTERIANA DE CÃES E GATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovada em: 15 / 10 / 2019

Nota: 10,0

Banca Examinadora

Prof<sup>o</sup>. Dr. Artur Cezar de Carvalho Fernandes -UFPB

Orientador

M. V. Me. Rafael Lima de Oliveira- UFPB

Examinador

Me. Sara Caroline Pinto de Almeida Santos – UFPB

Examinadora

*A Deus por sua infinita bondade e misericórdia que, por vezes, tornou-me capaz de realizar os meus sonhos, a toda minha família, em especial, aos meus pais, os que primeiro sempre me estenderam a mão, ao meu querido irmão, ao meu amado noivo, que, por vezes, dividiu aflições, ao meu querido primo, minha amada avó, tia e tio. E, por fim, aos meus queridos amigos que tornaram essa jornada mais alegre e mais leve.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus o meu mais profundo agradecimento, por todas as maravilhas realizadas em minha vida, pela coragem, determinação e força para enfrentar as adversidades da vida e, sobretudo, ao final desta jornada fortalecer minha fé.

À minha mãe, Maria Izabel Fernandes Gomes, meu alicerce. O apoio dos meus dias o meu maior incentivo e exemplo de amor e fé. Obrigada por partilhar os mais difíceis momentos de minha vida e em todos eles me ofertar consolo para as minhas aflições, suas sábias e doces palavras não me deixaram desistir.

Ao meu pai Josinaldo Gomes da Silva, obrigada por ser o maior incentivador dos meus sonhos e em todos eles me apoiar e ofertar o necessário para que fossem realizados, sem seu companheirismo e sábias palavras com certeza minha caminhada seria mais árdua. Agradeço por todas as renúncias feitas para me proporcionar sempre o melhor.

À minha família pelo amor incondicional em todos os momentos, por serem meu refúgio nos tempos de dificuldade, por serem meus maiores incentivadores ao longo desta caminhada, em especial minha querida avó, Maria José Fernandes, que com seus carinhos e cuidados me afagava e sua inabalável fé por vezes me fez prosseguir e ser mais forte. Agradeço também ao meu irmão, Felipe Fernandes Gomes, e aos meus primos, Elton Fernandes Barros e Ewerton Fernandes Barros (*in memoriam*) e meus tios maternos Maria da conceição Fernandes Barros e Eduardo de Souza Barros por todo amor e dedicação em diversas situações para que eu concluísse com êxito essa jornada, divido com vocês essa conquista.

Ao meu amado noivo, Geraldo Figueiredo de Santana Júnior, que por vezes foi solícito em me ajudar, obrigada por dividir tantas aflições, nesses anos juntos, agradeço sua amizade, amor e carinho.

Às amigas que fiz durante esses anos na universidade, Jucineide, Renalle, Claudiana, Andreza e Márcia, meu agradecimento, sem vocês eu teria fraquejado e tudo seria mais difícil sem cada risada e xícara de café. E às minhas amadas amigas que fiz durante o curso, Lillian Santos, Maria Cláudia Mendes e Sauane Richele, obrigada por serem sempre presentes meus amores, encontrei verdadeiros tesouros.

Ao meu querido amigo Arliston Pereira quem primeiro me acolheu no ambiente acadêmico e quem dividiu algumas dificuldades durante a realização deste trabalho.

À todos os participantes do projeto de extensão em saúde bucal em especial a Rafael Lima de Oliveira e Manuela Silveira, a vocês minha gratidão por despertarem em mim o amor pela odontologia veterinária, sem vocês nada disso seria possível, obrigada por me impulsionar e ajudar a alçar novos voos.

Ao meu Orientador, Professor Artur César de Carvalho, obrigada por toda paciência durante a realização deste trabalho, pelos sábios conselhos e por me transmitir a calma necessária.

À todos os professores e técnicos do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva aonde foi realizada esta pesquisa, em especial ao Prof. Felício Garino por ser solícito em todos os momentos e abdicar de seus afazeres para com maestria me ensinar, a Sara Santos que me conquistou com sua doçura e me proporcionou uma grande amizade, a Cláudio Monteiro por me acompanhar nos finais de semana para que eu pudesse concluir minha pesquisa e por sua amizade sincera, a Diogo Moura e Ana Luisa Lima pelo apoio e amizade.

À todos os animais que tive a oportunidade de cuidar e amar durante toda a minha vida, aqueles que já se foram saudades, aos que ainda permanecem meu amor e dedicação diária, obrigada por fazerem parte de minha vida e me transmitirem amor.

À Universidade Federal da Paraíba e a todos que fizeram parte da minha vida acadêmica direta ou indiretamente contribuindo para esta formação.

*“Onde fica a saída?”, perguntou Alice ao gato que ria. “Depende”, respondeu o gato. “De quê?”, replicou Alice. “Depende de para onde você quer ir...”*

*(Alice no País das Maravilhas)*



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Princípios ativos e suas respectivas diluições.....	19
Tabela 2. Grau de contaminação por bactérias Gram positivas submetidas a diferentes antissépticos testados.....	22
Tabela 3. Grau de contaminação por bactérias Gram negativas submetidas a diferentes antissépticos testados.....	22

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 - Distribuição dos grupos bacterianos em relação as espécies. ....	21
---	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

CHX: Clorexidina

CMI: Concentração mínima inibitória

ClO<sub>2</sub> : Dióxido de cloro

CSV: Compostos sulfurados voláteis

D1: Primeira diluição

D2: Segunda diluição

D3: Terceira diluição

DP: Doença periodontal

GRAM - : Gram Negativas

GRAM<sup>+</sup> : Gram Positivas

HV: Hospital veterinário

µl - Microlitro

OE: Óleos essenciais

pH: potencial hidrogeniônico

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

## RESUMO

As periodontites são as afecções de maior incidência na clínica veterinária de pequenos animais, correspondendo a cerca de 85% de animais afetados. Atualmente, são poucos os produtos disponíveis no mercado capazes de combater os microrganismos causadores dessas patologias orais. Dessa forma, este trabalho buscou avaliar *in vitro* a efetividade de três compostos com atividades antissépticas descritas em literatura, gluconato de clorexidina (CHX), óleos essenciais (OE), e dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>). A concentração mínima inibitória (CMI) de cada antisséptico foi avaliada através da técnica de microdiluição em tubos, realizada em três tempos, a fim de avaliar as concentrações capazes de inibir a atividade microbiana nas amostras. Sob a divisão de dois grupos de microrganismos: gram positivos e gram negativos. Foi feita a avaliação dos dados empregando-se a análise de variância, sendo os resultados submetidos ao teste de Tukey com nível de significância  $p < 0,05\%$ . Assim, com o OE, observou-se a inibição do crescimento bacteriano nas amostras em todas as concentrações e diluições do princípio ativo; a clorexidina apresentou a segunda melhor resposta comparada aos OE em gram negativas, porém, quando testada em gram positivas, obteve capacidade de inibição bacteriana em todas as amostras e diluições testadas; e o dióxido de cloro foi o composto que menor apresentou atividade antimicrobiana em todos os tempos e concentrações. Com isso, através dos testes realizados *in vitro*, foi possível observar que os compostos utilizados apresentam diferentes potenciais antimicrobianos entre si, variando conforme os grupos bacterianos utilizados na pesquisa. Adicionalmente, foi possível observar que a classe de microrganismos com maior incidência na região da gengiva e periodonto dos cães e gatos foi de bactérias gram negativas nas amostras coletadas.

**Palavras-chave:** Saúde bucal, Antissépticos, Atividade antimicrobiana, Periodontite.

## ABSTRACT

The periodontitis are the affections with most incidence on the small animal veterinary clinic, corresponding to about 85% of affected animals. Actually, there are few products available in the market that can combat the microorganisms that cause these oral pathologies. Thus, this academical work sought to evaluate in vitro the effectiveness of three compounds with antiseptic activities described in the literature, chlorhexidine gluconate (CHX), essential oils (EO), chlorine dioxide (CLO<sub>2</sub>). The minimum inhibitory concentration (MIC) of each antiseptic was evaluated through the technique of microdilution in tubes, fulfilled in three times, in order to evaluate the concentrations capable of inhibiting microbial activity in samples. Under division of two microorganisms groups: gram positive and gram negatives. Data evaluation was performed using analysis of variance, being the results submitted to the Tukey test with significance level  $p(<0,05\%)$ . So with the EO, it was observed the inhibition of bacterial growth in the samples at all active ingredient concentrations and dilutions; The chlorhexidine presented the second best response compared to EO in negative grams, however, when tested in positive grams, obtained bacterial inhibition ability at all samples and tested dilutions; and the chlorine dioxide was the smallest compound with antimicrobial activities at all times and concentrations. Thereby, through in vitro tests, it was possible to observe that the compounds used present different antimicrobial potentials each other, varying as the bacterian group used in the research. Additionally, it was possible to note that the class of microorganisms with the most incidence in the gum and periodontal area of dogs and cats was gram negative bacteria in the collected samples.

**Keywords:** Oral health, Antiseptics, Antimicrobial activity, Periodontitis.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVO .....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Aspectos Éticos.....	18
3.2. Amostragem.....	18
3.3. Antissépticos Utilizados.....	18
3.4. Análise Microbiológica.....	19
3.5. Determinação da Concentração Mínima Inibitória.....	19
3.6. Análise Estatística.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	24
6.REFERÊNCIAS .....	24
ANEXO 1 – TERMO DE AUTORIZAÇÃO .....	27
ANEXO 2 – CERTIDÃO DE APROVAÇÃO (CEUA) .....	28

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo Duboc (2009), a odontologia veterinária vem apresentando expressivo desenvolvimento nos últimos anos, se tornando uma área de atuação da medicina veterinária que vem ganhando espaço entre as especialidades. Este fato deve-se ao crescente número de tutores que buscam informações a respeito da saúde bucal de seus animais, o que contribui para que haja uma melhor perspectiva acerca de tratamento das enfermidades que acometem a cavidade oral.

Contudo, a manutenção da saúde bucal é essencial não só para as pessoas, mas também para os animais, sendo um fator determinante para prevenção das afecções orais, como também, de doenças provenientes de condições sistêmicas que tem início na boca.

Inúmeras são as patologias que acometem a cavidade oral de cães e gatos, dentre elas podemos citar as neoplasias, a reabsorção dentária e o complexo gengivite-estomatite-faringite em felinos, porém a periodontite destaca-se sendo a afecção de maior ocorrência diagnosticada nos animais de estimação, correspondendo a cerca de 85% de animais afetados (GARCIA et al. 2008; WATSON, 2006).

A doença periodontal (DP) se inicia pelo acúmulo de bactérias imóveis, gram positivas e aeróbias na região cervical do dente, ou seja, a região da coroa dentária, que se localiza mais próximo ao sulco gengival, formando o biofilme (MARRETA, 2001; BRAGA et al., 2005). A inflamação instalada e a contínua proliferação bacteriana podem acarretar retração ou hiperplasia gengival, formando assim cavidades gengivais que favorecem ainda mais o acúmulo de bactérias, passando então a predominar as bactérias anaeróbias, geralmente Gram negativas (HARVEY e EMILY, 1993).

De acordo com o grau de severidade da DP, é possível classificá-la em quatro estágios (WHYTE et al., 2014), sendo eles: 0 - Gengiva saudável: apresenta margem fina, brilhante, normocorada, firme, ausência de dor e aspecto granulado; 1 – Gengivite marginal: apresenta a margem da gengiva livre e de coloração avermelhada; 2 - Gengivite leve: inflamação da gengiva com edema, vermelhidão, inchaço e leve enrolamento da margem gengival; 3 – Gengivite moderada: pode ou não haver presença de cálculo dentário, edema acentuado, coloração bem avermelhada, enrolamento da margem gengival, presença de bolsas gengivais entre 4 e 6 mm de profundidade, dentes firmes, com possível retração gengival e 4 - Periodontite severa: inflamação severa, com formação de bolsas gengivais com mais de 6

mm, presença de pus, mobilidade dentária, perda de fixação epitelial e óssea (TELHADO et al., 2004).

A identificação clínica da DP pode ser realizada através da observação dos sinais clínicos apresentados como halitose intensa, sialorreia espessa, hemorragia oral, mobilidade dentária, cálculo e gengivite (GIOSO, 2003).

Estas alterações podem causar desconforto oral, levando o animal a menor ingestão de alimento e água, menor aproveitamento nutricional, perda de peso e consequentemente diminuição da qualidade de vida (SILVA, 2009).

O método de eleição para profilaxia da formação da placa bacteriana é a escovação diária, capaz de promover a desorganização do biofilme, porém em alguns casos que não seja possível a remoção através de escovação, podemos realizar o controle químico através da utilização de antissépticos orais. Esses agentes auxiliam na redução da concentração de microrganismos patogênicos e comensais da cavidade oral e, consequentemente, na redução da formação da placa dental. Uma vez estabelecida a placa dental, estes produtos não possuem a capacidade de removê-la, tão pouco, o cálculo dentário (GIOSO e CARVALHO, 2004).

Alguns compostos, como a clorexidina, têm se mostrado efetivos quando utilizados para o controle da microbiota e saúde oral em cães e gatos (BELLOWS, 2003).

O gluconato de clorexidina (CHX) é um dos antissépticos mais utilizados para higienização oral de cães e gatos. De acordo com Gouveia (2009), o CHX atua no controle químico da placa bacteriana apresentando atividade antifúngica e bactericida capaz de eliminar tanto bactérias gram-positivas, como gram-negativas.

Ainda, segundo SEMENOFF (2008) o CHX apresenta um amplo aspecto de ação e efeito farmacológico inibidor de biofilme e sua principal característica é a substantividade, ou seja, capacidade de se adsorver aos tecidos bucais e permanecer ativa até 12 horas na cavidade oral. Entretanto, seus efeitos adversos como a alteração de paladar, sabor desagradável e surgimento de manchas limitam seu uso a curtos períodos.

A utilização de óleos essenciais (OE) é comumente vista em fabricações comerciais de enxaguatórios da linha humana como o Listerine®. Este possui em sua composição uma combinação fixa de óleos essenciais, que são 0.064% de timol, 0.092% de eucaliptol, 0.060% de salicilato de metila e 0.042% de mentol (CHARLES et al., 2004). Os OE são aromáticos, obtidos por destilação de plantas e evaporam quando expostos ao ar em temperaturas normais, a incorporação de óleos nos enxaguatórios tem como objetivo favorecer a inibição do



desenvolvimento do biofilme, pela redução da aderência a película bacteriana. Estes compostos agem inespecificamente sobre as bactérias, reduzindo os sinais clínicos de inflamação na gengivite pois afetam a formação do biofilme dentário, diminuindo a síntese de prostaglandinas e a quimiotaxia para os neutrófilos (FILOGÓNIO, 2011).

Outro composto utilizado na fabricação de antissépticos é o dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), presente em alguns produtos comerciais, atuando como um agente antimicrobiano capaz de reduzir ou eliminar alguns microrganismos patogênicos, além de ter a habilidade de oxidar os aminoácidos metionina e cisteína, ambos precursores dos compostos sulfurados voláteis (CSV). Também não causa danos caso seja deglutido acidentalmente durante a realização do bochecho, e como é um composto sem álcool e sem açúcar em sua formulação, não causa irritação nas mucosas orais (OLIVEIRA, 2018).

A ação química do  $\text{ClO}_2$  impede a proliferação dos microrganismos, e o grande diferencial do produto, frente a outros bactericidas de uso oral, é que não tem contraindicação de uso. O  $\text{ClO}_2$  possui efeito prolongado, pH balanceado, ausência de corantes que mancham os dentes e ausência de agentes carcinogênicos, podendo ser seguramente utilizado como complemento da higiene oral diária (OLIVEIRA, 2018).

Quando, em estágios avançados da DP, é inevitável a realização do tratamento cirúrgico para a remoção dos cálculos e placas bacterianas, para isso é necessário que o animal seja anestesiado e que o procedimento seja realizado exclusivamente por um médico veterinário, utilizando materiais e equipamentos adequados para realizar a remoção dos cálculos e posterior polimento dentário (GIOSO, 2007). Tais procedimentos podem ser associados ao uso de antissépticos bucais e têm como finalidade impedir a progressão da doença.

Alguns fatores são de grande importância no controle desta afecção, como a conscientização e informação dos proprietários acerca da realização dos métodos profiláticos para manutenção da saúde oral de seus animais, e a busca de serviço veterinário especializado para o animal pelo menos uma vez ao ano para avaliação da saúde bucal. É importante salientar que a DP ocorre de maneira silenciosa e por vezes os sinais clínicos são observados já em estágios avançados. Portanto o diagnóstico precoce oferece melhores chances de tratamento e uma melhor qualidade de vida para o animal.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Avaliar *in vitro* a eficiência de três produtos com propriedades antissépticas no controle de bactérias da cavidade oral.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Isolar e identificar as bactérias associadas a doença periodontal com base na constituição da parede celular de cães e gatos atendidos no hospital veterinário da UFPB;
- Avaliar a efetividade, *in vitro*, de três princípios ativos sobre bactérias gram positivas e gram negativas, associados a doença periodontal em cães e gatos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Aspectos Éticos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob parecer N° 2309150519. Todos os tutores que voluntariaram seus animais receberam os esclarecimentos necessários e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido.

#### 3.2. Amostragem

Foram utilizadas 20 amostras, sendo 10 cães e 10 gatos, independente de raça ou sexo, adultos, acometidos pela doença periodontal, classificados nos Graus 2, 3 ou 4 da doença periodontal, mediante avaliação clínica, oriundos do atendimento do projeto de extensão em odontologia, no Hospital Veterinário da UFPB, as amostras foram coletadas no período de maio a agosto de 2019.

De cada animal enquadrado na classificação da doença periodontal foi coletada uma amostra da cavidade oral, através do uso de escova citológica estéril aplicada sobre toda a região do periodonto nas faces gengival, lingual, dentária e vestibular. Após coletados, os materiais foram acondicionados em meio Stuart e semeados em placas de petri contendo meio de cultura por até 24 horas.

#### 3.3. Antissépticos Utilizados

Foram testados três antissépticos para realizar as diluições *in vitro*, sendo dois destes utilizados comumente na linha humana. O primeiro, composto a base de óleos essenciais, 0.064% de timol, 0.092% de eucaliptol, 0.060% de salicilato de metila e 0.042% de mentol, comercialmente denominado Listerine® Zero. A segunda formulação, contendo gluconato de clorexidina a 0,12%, Periotrat®. Por fim, o terceiro produto utilizado foi de uso veterinário, composto por dióxido de cloro estabilizado 0,1%, conhecido por Dental Splash®. Nenhum dos compostos utilizados continham em suas composições álcool ou flúor.

### 3.4. Análise Microbiológica

Os materiais coletados foram semeados em ágar sangue e ágar MacConkey, ambos do fabricante KASVI, incubados a 37 °C em estufa bacteriológica (QUIMIS®) em aerobiose, sendo realizadas leituras com 24 e 48 horas após a incubação.

Os microrganismos isolados foram identificados através da técnica de coloração de Gram (MURRAY et al., 2009), na qual após a separação do material em lâmina de vidro, é adicionado o corante cristal violeta, seguida pela adição da solução de iodo para formar um complexo com o corante primário. Durante a descoloração com solução de álcool-acetona, o complexo é mantido nas bactérias gram positivas, porém é perdido nas bactérias gram negativas; a contra coloração com safranina é retirada pelos microrganismos gram negativos.

As análises foram realizadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Hospital Veterinário, Centro de Ciências Agrárias da UFPB.

### 3.5. Determinação da Concentração Mínima Inibitória

Após isoladas as amostras, procedeu-se a realização da concentração mínima inibitória (CIM) de acordo com os métodos descritos pelo CLSI (2005), para assim avaliar a eficácia dos antissépticos com base nos diferentes princípios ativos e suas respectivas concentrações. As diluições foram avaliadas após 1, 5 e 10 minutos de exposição aos princípios ativos.

Tabela 1: Princípios ativos e suas respectivas diluições.

Princípios Ativos	D1	D2	D3
Dióxido de cloro estabilizado	0,1%,	05%	0,025%
Gluconato de clorexidina	0,12%,	0,06%	0,03%
Óleos essenciais:	—	—	—
Timol	0,064%	0,032%	0,016%
Eucaliptol	0,092%	0,046%	0,023%
Salicilato de Metila	0,060%	0,03%	0,015%
Mentol	0,042%	0,021%	0,010%

Para tanto, suspensões bacterianas homogêneas foram preparadas em solução salina estéril correspondente a turvação 0,5 da escala McFarland, para serem utilizadas como inóculos, oriundas dos cultivos em ágar sangue e MacConkey dos materiais coletados por meio de *swab* de cada paciente.

Para cada antisséptico utilizado foram avaliadas amostras em duplicata, sendo a solução constituída inicialmente por 1 ml do antisséptico, em seguida, adicionou-se 100 µl da suspensão bacteriana e procederam-se as diluições em tubos contendo 1 ml de Mueller Hinton Caldo (KASVI®), para posterior incubação a 37°C em estufa bacteriológica por 24h. Como citado anteriormente, as avaliações foram realizadas para os tempos 1, 5 e 10 minutos de exposição dos isolados ao antisséptico.

Procedeu-se a leitura das amostras através do método colorimétrico adicionando-se aos tubos 20 µl de resazurina sódica a 0,01%, incubado a 37°C e aguardando o tempo de 40 minutos para leitura dos resultados, de acordo com Bonam et al. (2010) momento em que a coloração azul demonstra a inatividade bacteriana e a vermelha atividade bacteriana.

Os tubos correspondentes a coloração vermelha, apresentando atividade bacteriana foram repicados em placas em meio sólido, ágar sangue, incubados a 37°C por 24h, com a finalidade de confirmar a presença do microrganismo na solução.

### **3.6. Análise Estatística**

O delineamento experimental foi desenvolvido inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3x3 (3 antissépticos – clorexidina, dióxido de cloro e óleos essenciais; 3 concentrações – D1, D2 e D3).

Os tratamentos foram submetidos a análise de variância pelo teste de Tukey pelo programa estatístico SISVAR®.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Do total das 20 amostras coletadas da cavidade oral dos animais, 40% (8/20) corresponderam ao grupo de bactérias gram positivas, sendo 37,5% encontradas em cães, e 62,5% em gatos. Adicionalmente, 60% (12/20) dos isolados apontaram bactérias gram negativas, sendo 58,33% observada em cães, e 41,67% em gatos.

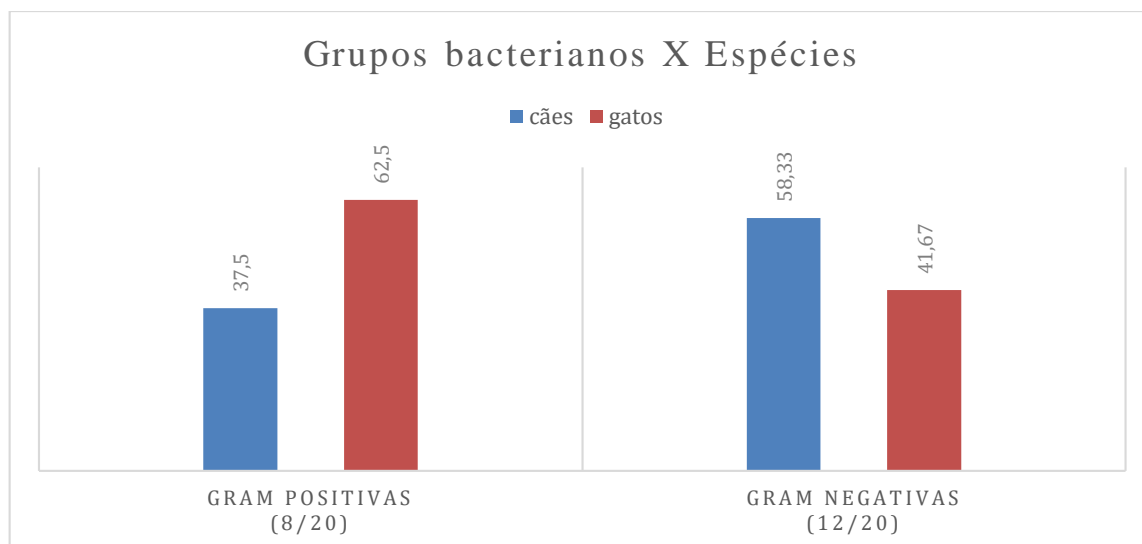


Figura 1 - Distribuição dos grupos bacterianos em relação as espécies.

Assim, foi possível observar que houve uma maior incidência de bactérias Gram negativas nas amostras avaliadas. Dessa forma, os resultados encontrados podem evidenciar a progressão da DP na cavidade oral destes animais. A microbiota bucal é diversa e está constituída, predominantemente, por bactérias Gram negativas, que possuem a capacidade de colonizar, invadir, produzir produtos tóxicos e gerar resposta imunológica com consequente agressão aos tecidos do hospedeiro, como descrito por Feng e Weinberg (2006).

Após a realização do isolamento e divisão dos grupos quanto a classificação da coloração de Gram, procedeu-se com a realização dos testes dos antissépticos, e os resultados foram expressos nas tabelas 2 e 3.

Os dados apresentados na tabela 2, considerando amostras envolvendo a atividade da substância gluconato de clorexidina sobre o grupo de bactérias Gram positivas, demonstram que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) para os testes realizados com diferentes concentrações (0,12%, 0,6%, 0,3%), indicando que não houve crescimento microbiano nas amostras, sugerindo a ação efetiva do emprego da mesma pelo seu potencial bactericida. McBain et al (2003) utilizando metodologia semelhante a este estudo, compararam dois antissépticos humanos disponíveis comercialmente, verificando que os antissépticos contendo Triclosan e Clorexidina apresentaram alto potencial antimicrobiano frente a bactérias orais, sendo que o valor da CIM para o Triclosan foi menor que a obtida para Clorexidina.

Tabela 2. Grau de contaminação por bactérias Gram positivas submetidas a diferentes antissépticos testados.

Tratamentos	Concentrações			Média tratamento
	D1	D2	D3	
Clorexidina	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0
Dióxido de cloro	50 Ab	50 Ab	60 Bb	53.33
Óleos essenciais	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0
Média concentração	16.67	16.67	20	

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas são iguais entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Números correspondem a porcentagem de contaminação.

Resultados semelhantes à Clorexidina foram encontrados nas análises das soluções contendo OE, não havendo diferença estatística ( $p > 0,05$ ) para as concentrações avaliadas (D1, D2 e D3), que promoveram efetiva inibição do crescimento microbiano nas amostras. Os resultados foram observados tanto para bactérias Gram positivas quanto para bactérias Gram negativas, como apresentado nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Nesse contexto, Meiller et al. (2001), utilizando a técnica de concentração mínima inibitória, avaliaram a eficácia antifúngica de três formulações antissépticas contendo óleos essenciais e uma contendo gluconato de clorexidina, revelando que todos os produtos testados obtiveram ação antifúngica, mas as formulações contendo OE mostraram-se mais efetivas frente aos patógenos orais.

Em outro estudo, Bugno et al. (2006), utilizando metodologia de regressão linear, testaram a efetividade de seis compostos antissépticos disponíveis comercialmente. Em seus ensaios, o composto contendo OE evidenciou a melhor atividade antimicrobiana sobre as amostras testadas de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Tabela 3. Grau de contaminação por bactérias Gram negativas submetidas a diferentes antissépticos testados.

Tratamentos	Concentrações			Média tratamento
	D1	D2	D3	
Clorexidina	0.0 Aa	16.7 Bb	16.7 Bb	11.1
Dióxido de cloro	25.0 Ab	91.7 Bc	91.7 Bc	69.5
Óleos essenciais	0.0 Aa	0.0 Aa	8.3 Aa	2.8
Média concentração	8.3	36.1	38.9	

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas são iguais entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Números correspondem a porcentagem de contaminação.

De acordo com os resultados da presente pesquisa, foi possível observar que a Clorexidina apresentou melhor desempenho em sua primeira diluição (0,12%), sendo as diluições subsequentes (0,06% e 0,03%) de menor eficiência quando avaliadas para o grupo de bactérias Gram negativas, foi possível observar efeito significativo ( $p < 0,05$ ) entre as amostras havendo 16,7% de contaminação nas concentrações D2 e D3, enquanto a D1 apresentou-se mais efetiva, capaz de reduzir a 0% o nível de contaminação microbiológica, como apresentado na tabela 3.

Em relação ao dióxido de cloro, considerando as bactérias Gram positivas (tabela 2) e negativas (tabela 3), a substância mostrou-se menos efetiva em todas as amostras testadas quando comparada aos outros dois princípios ativos avaliados. As diluições D2 e D3 tiveram o pior desempenho apresentando 91,7% de contaminação, o índice mais alto nas amostras avaliadas para os dois grupos de bactérias. Tais resultados encontrados nesta pesquisa podem ser explicados devido à baixa concentração utilizada, pois a maioria dos estudos envolvendo o dióxido de cloro está associada à redução de compostos sulfurados voláteis (CSV) descrito em pesquisas humanas.

A utilização do dióxido de cloro é observada em pesquisas da linha humana, onde é amplamente utilizado como oxidante capaz de reduzir os CSV, sendo também utilizado como antisséptico para cavidade oral e próteses dentárias (SHINADA et al., 2010).

Peruzzo et al. (2007), através de um estudo randomizado em humanos, também avaliou o uso do enxaguatório de dióxido de cloro a 0,01% para inibir a formação matinal de CSV comparando a um placebo, onde os níveis de CSV foram medidos com o uso do monitor de sulfetos. Os resultados sugeriram que o uso do enxaguatório contendo dióxido de cloro pode promover a manutenção de baixos níveis de CSV no hálito matinal.

Diante dos resultados expostos nas tabelas, foi possível observar a inibição no crescimento bacteriano, ou seja, o efeito bacteriostático nas amostras sob o efeito do OE em todas as concentrações e diluições deste princípio ativo. Em relação a CHX, observou-se a segunda melhor resposta comparada aos OE sobre as bactérias Gram negativas, porém, quando testada no grupo de bactérias Gram positivas, observou-se capacidade de inibição bacteriana em todas as diluições testadas nas amostras. Nas análises, o dióxido de cloro foi o composto que menor apresentou atividades antimicrobianas em todos os tempos e concentrações testadas.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível observar que o grupo de maior incidência nas amostras coletadas da região de gengiva e periodonto dos cães e gatos, atendidos no projeto de saúde bucal, corresponde a bactérias Gram negativas.

Através dos testes realizados *in vitro* foi possível inferir que os compostos utilizados apresentam diferentes potenciais antimicrobianos entre si e que esses resultados variam conforme os grupos bacterianos isolados nesta pesquisa. Desta forma, fica clara a necessidade de maiores estudos acerca da ação dos referidos princípios ativos sobre as diferentes espécies envolvidas em doenças periodontais de cães e gatos, bem como, a necessidade do conhecimento do perfil microbiológico envolvido nos processos patológicos, para dessa forma realizar a escolha de antissépticos efetivos.

Os compostos que apresentam maior potencial de inibição frente aos microrganismos testados são os OE em todas as concentrações testadas para todos os grupos avaliados e o gluconato de clorexidina em todas as diluições para o grupo de bactérias Gram positivas, exceto para o grupo de bactérias Gram negativas, onde apenas em sua primeira diluição (0,12%) obteve melhor desempenho. Contudo, o dióxido de cloro se mostrou menos efetivo em todos os tempos e concentrações, quando comparado aos outros dois compostos utilizados para a realização desta pesquisa.

Também foi possível realizar a avaliação para utilização de outros compostos antissépticos bucais para cães e gatos, sendo uma alternativa frente a utilização da clorexidina e seus efeitos adversos, sendo contudo, necessários estudos adicionais *in vivo* para se avaliar os efeitos do OE em animais.

## 6.REFERÊNCIAS

1. BONAN, P. R. F. et al. Avaliação do estresse térmico de *Candida albicans* utilizando microplacas e resazurina como indicador de oxidação. In: FÓRUM – DESENVOLVIMENTO REGIONAL: COMPROMISSO DA UNIMONTES, 4. Montes Claros: Unimontes, 2010.
2. BUGNO, A. et al. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. Rev Inst Adolfo Lutz, n. 65(1), p. 40-45, 2006.

3. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. Pennsylvania: CLSI, 2005. (Document M100-S15).
4. DELLE VEDOVE SEMENOFF, Tereza A.; SEMENOFF-SEGUNDO, Alex; BIASOLI, Éder Ricardo. Efetividade antimicrobiana in vitro de enxaguatórios bucais frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Odonto Ciencia**, v. 23, n. 4, 2008.
5. FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontol.** 2000, v. 40, p. 50-76, 2006.
6. FILOGÔNIO, C. F. B. et al. A efetividade de óleos essenciais no controle químico do biofilme e na prevenção da cárie dentária. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 11, n. 3, p. 465-469, 2011.
7. GIOSO, M. A.; CARVALHO, V. G. G. Métodos preventivos para a manutenção da boa saúde bucal em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, n. 52, p. 68-76, 2004.
8. GOUVEIA, Ana Isabel Escudeiro Aguiar. *DOENÇA PERIODONTAL NO CÃO*. 2009. 93 f. Dissertação de mestrado - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2009.
9. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of triclosan-containing rinse on the dynamics and antimicrobial susceptibility of in vitro plaque ecosystems. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3531-8.
10. Meiller TF, Kelley JI, Jabra-Rizk MA, DePaola LG, Abdullahel Baqui AAM, Falkler WA. In vitro studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 663-70.
11. MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 7ed. Washington. D.C., 2009.
12. OLIVEIRA, M. A. R. Soluções antimicrobianas utilizadas em UTI: uma revisão da literatura. 2018. 20f. Trabalho de conclusão de curso – Odontologia, BAURU, 2018.
13. PERUZZO, D. C.; JANDIROBA, P. F. C. B.; NOGUEIRA FILHO, G. R. Uso do enxaguatório dióxido de cloro a 0,1% para inibir a formação matinal de compostos sulfurosos voláteis (CSV). *Braz. Oral Res.*, v.21, n.1, p. 70-77, 2007.
14. SHINADA, Kayoko et al. Effects of a mouthwash with chlorine dioxide on oral malodor and salivary bacteria: a randomized placebo-controlled 7-day trial. **Trials**, v. 11, n. 1, p. 14, 2010.

15. SILVA, R. V. Doença Periodontal em Cães: Revisão de Literatura. 2009. 77 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Clínica Médica em Pequenos Animais)-Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2009.
16. BELLOWS, J. Periodontopatias. In: TILLEY, L. P.; SMITH JUNIOR, F.W.K. **Consulta Veterinária em Cinco Minutos: Espécies Canina e Felina**. 2. ed. Barueri (SP): Manole, 2003, p. 142 – 143.
17. OLIVEIRA, J. M. G. Doença periodontal em cães e gatos. 2007. 18p. Monografia (Especialização *latusensu* em Clínica Médica e cirúrgica em Pequenos Animais – Universidade Castelo Branco, Minas Gerais.
18. WATSON, A. D. J. Diet and periodontal disease in dogs and cats. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, p. 313-318, 2006.
19. BRAGA, C.A.S.B. et al. Isolamento e identificação da microbiota periodontal em cães da raça Pastor Alemão. **Ciência Rural**, v.5, n.2, p.385-390, 2005.
20. MARRETA, S.M. Recognition and treatment of periodontal disease. In: THE ATLANTIC COAST VETERINARY CONFERENCE, 2001, New Jersey, USA. Proceedings... New Jersey: ACVC, 2001.
21. HARVEY, C. E.; EMILY, P. P.; **Small animal dentistry**. St. Louis: Mosby Year Book, p.413, 1993.
22. GIOSO, M.A. **Odontologia veterinária para o clínico de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole. 2007. p.1-23.
23. GIOSO, M. A. **Odontologia para o Clínico de Pequenos Animais**. (2ª Ed., p. 202). São Paulo. 2003.
24. TELHADO, J. et al. Incidência de cálculo dentário e doença periodontal em cães da raça pastor alemão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 2, p. 99-104, 2004.
25. WHYTE, A. et al. Canine stage 1 periodontal disease: A latent pathology. **The Veterinary Journal**, Spain,v. 201 p.118–120, 2014.
26. CHARLES, C.H et al. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and a essential oil mouthrinse: 6- month clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology** 2004; 31: 878-884.

**ANEXO 1 – TERMO DE AUTORIZAÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
HOSPITAL VETERINÁRIO**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado (a) Senhor (a)

O atendimento clínico e/ou cirúrgico será realizado por um médico veterinário no Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Todos os dados fornecidos pelo tutor em ambulatório ficarão disponíveis ao Hospital Veterinário para futuros levantamentos e realização de trabalhos científicos. Solicita-se a colaboração e autorização do tutor para apresentar os resultados dos estudos em eventos da medicina veterinária. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos. Esclarecemos que sua autorização é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido (a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados.

( ) Não está de acordo

( ) Está de acordo

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Tutor Responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

Areia, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO 2 – CERTIDÃO DE APROVAÇÃO (CEUA)



Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Reitoria



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação in vitro da efetividade de antissépticos bucais no controle da placa bacteriana de cães e gatos.", protocolada sob o CEUA nº 2309150519 (ID 000673), sob a responsabilidade de **Artur Cezar de Carvalho Fernandes e equipe; Andreza Fernandes Gomes; Rafael Lima de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 24/05/2019.

We certify that the proposal "In vitro evaluation of the effectiveness of oral antiseptics in the control of bacterial plaques in dogs and cats.", utilizing 10 Dogs (males and females), 10 Cats (males and females), protocol number CEUA 2309150519 (ID 000673), under the responsibility of **Artur Cezar de Carvalho Fernandes and team; Andreza Fernandes Gomes; Rafael Lima de Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/24/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2019 a 10/2019**

Área: **Ciência Animal**

Origem:	<b>Não aplicável biotério</b>	sexo:	<b>Machos e Fêmeas</b>	idade:	<b>5 a 15 anos</b>	N:	<b>10</b>
Espécie:	<b>Cães</b>			Peso:	<b>5 a 20 kg</b>		
Linhagem:	<b>Não específico</b>						
Origem:	<b>Não aplicável biotério</b>	sexo:	<b>Machos e Fêmeas</b>	idade:	<b>5 a 15 anos</b>	N:	<b>10</b>
Espécie:	<b>Gatos</b>			Peso:	<b>3 a 5 kg</b>		
Linhagem:	<b>sem linhagem específica</b>						

Local do experimento: Hospital Veterinário do CCA da UFPB

João Pessoa, 21 de outubro de 2019

*Isolania Gisela A. Gonçalves*

Profa. Dra. Isolania Gisela Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

*Ricardo Romão Guerra*

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba